

B1



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | | |
|--|--|----|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12P 13/00 | | A2 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/18228 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. April 1999 (15.04.99) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06210 (22) Internationales Anmeldedatum: 30. September 1998 (30.09.98) (30) Prioritätsdaten: 197 43 894.6 4. Oktober 1997 (04.10.97) DE 198 31 609.7 14. Juli 1998 (14.07.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Postfach 1913, D-52425 Jülich (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EIKMANN, Bernd [DE/DE]; Gleißelstetten 49, D-89081 Ulm (DE). PE- TERS-WENDISCH, Petra [DE/DE]; Steinenkamp 1, D-51496 Bergisch-Gladbach* (DE). SAHM, Hermann [DE/DE]; Wendelinusstrasse 71, D-52428 Jülich (DE). (74) Anwalt: PIELKEN, Petra; Becker-Gundahl-Strasse 36, D-81479 München (DE). | | | (81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, HU, ID, JP, KR, MX, RU, SK, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i> |

(54) Title: METHOD FOR MICROBIAL PRODUCTION OF AMINO ACIDS OF THE ASPARTATE AND/OR GLUTAMATE FAMILY AND AGENTS WHICH CAN BE USED IN SAID METHOD

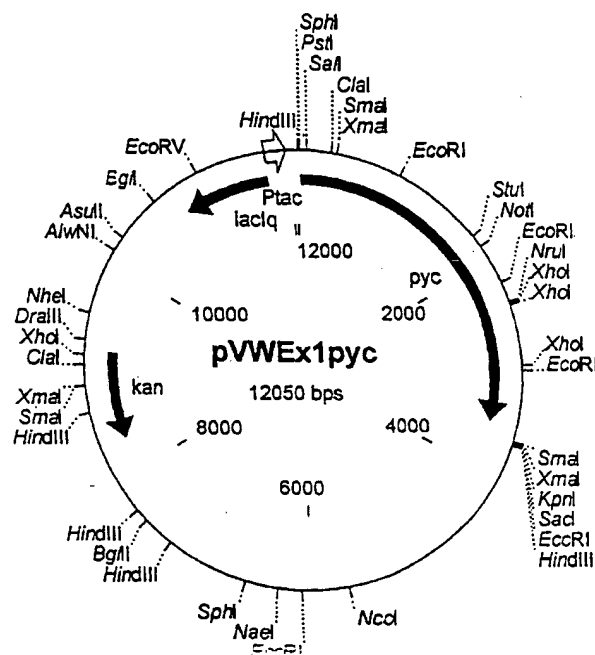
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR MIKROBIELLEN HERSTELLUNG VON AMINOSÄUREN DER ASPARTAT- UND/ODER GLUTAMATFAMILIE UND IM VERFAHREN EINSETZBARE MITTEL

(57) Abstract

The invention relates to a method for microbial production of amino acids of the aspartate and/or glutamate family in which the pyruvate-carboxylase activity is increased by genetically changing the enzyme and/or the pyruvate-carboxylase gene expression of a microorganism which produces the corresponding amino acid. In addition, the invention relates to a pyruvate-carboxylase gene and additional agents which can be used in the inventive method.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie, bei dem die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität durch genetische Veränderung des Enzyms und/oder die Pyruvat-Carboxylase-Genexpression eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung ein Pyruvat-Carboxylase-Gen sowie weitere, im erfindungsgemäßen Verfahren einsetzbare Mittel.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|--------------------------------------|----|--|----|-----------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidshan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | ML | Mali | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | MN | Mongolei | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MR | Mauritanien | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MW | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MX | Mexiko | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen | | |
| CM | Kamerun | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CU | Kuba | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| CZ | Tschechische Republik | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Deutschland | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| DK | Dänemark | LR | Liberia | SG | Singapur | | |
| EE | Estland | | | | | | |

Beschreibung

5

Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie und im Verfahren einsetzbare Mittel

10

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie gemäß den Ansprüchen 1 bis 17, Pyruvat-Carboxylase-Gene nach Anspruch 18 bis 23, Genstrukturen nach Anspruch 24, Vektoren nach Anspruch 25, transformierte Zellen nach Anspruch 26 bis 31 sowie

15 Verwendungen nach Anspruch 32 bis 37.

Aminosäuren sind von großem wirtschaftlichen Interesse, wobei die Verwendung von Aminosäuren vielfältig ist: So wird z.B. L-Lysin wie auch L-Threonin, L-Methionin und L-Tryptophan als Futtermittelzusatz benötigt, L-Glutamat als Gewürzzusatz, L-

20 Isoleucin und L-Tyrosin in der pharmazeutischen Industrie, L-Arginin und L-Isoleucin als Medikament oder L-Glutamat, L-Aspartat und L-Phenylalanin als Ausgangssubstanz zur Synthese von Feinchemikalien.

Eine bevorzugte Methode zur Herstellung dieser verschiedensten Aminosäuren ist die

25 biotechnologische Herstellung mittels Mikroorganismen; denn auf diese Weise wird direkt die biologisch wirksame und optisch aktive Form der jeweiligen Aminosäure erhalten, und es können einfache und preisgünstige Rohstoffe eingesetzt werden. Als Mikroorganismen werden z.B. *Corynebacterium glutamicum* und seine Verwandten *ssp. flavum* und *ssp. lactofermentum* (Liebl et al., Int J System Bacteriol 1991, 41: 255 bis 260) wie auch *Escherichia coli* und verwandte Bakterien eingesetzt.

30

Diese Bakterien produzieren die Aminosäuren normalerweise aber nur in der zum Wachstum benötigten Menge, so daß also keine überschüssigen Aminosäuren gebildet und ausgeschieden werden. Dies ist darin begründet, daß in der Zelle die Biosynthese der Aminosäuren in vielfacher Weise kontrolliert wird. Folglich sind bereits verschiedenste Verfahren bekannt, um die Produktbildung durch Ausschalten der Kontrollmechanismen zu steigern. Bei diesen Prozessen werden z.B. Aminosäureanaloga eingesetzt, um die effektive Regulation der Biosynthese auszuschalten. So ist beispielsweise ein Verfahren beschrieben, bei dem Corynebacterium-Stämme benutzt werden, die gegen L-Tyrosin- und L-Phenylalaninanaloga resistent sind (JP 19037/1976 und 39517/1978). Ebenso sind Verfahren beschrieben, bei denen gegenüber L-Lysin- oder auch L-Theoninanaloga resistente Bakterien eingesetzt werden, um die Kontrollmechanismen zu überwinden (EP 0 205 849, GB 2 152 509).

Weiterhin sind auch durch rekombinante DNA-Techniken konstruierte Mikroorganismen bekannt, bei denen ebenfalls die Regulation der Biosynthese aufgehoben ist, indem die Gene, die für die nicht mehr feedback-inhibierbaren Schlüsselenzyme kodieren, kloniert und exprimiert werden. So ist z.B. ein rekombinantes, L-Lysin produzierendes Bakterium mit plasmid-kodierter, feedback-resistenter Aspartatkinase bekannt (EP 0 381 527). Ebenso ist ein rekombinantes, L-Phenylalanin produzierendes Bakterium mit feedback-resistenter Prephenatdehydrogenase beschrieben (JP 123475/1986, EP 0 488 424).

Darüber hinaus wurden auch durch Überexpression von Genen, die nicht für feedback-sensitive Enzyme der Aminosäuresynthese kodieren, erhöhte Aminosäureausbeuten erreicht. So wird z.B. die Lysinbildung durch erhöhte Synthese

der Dihydrodipicolinatsynthase verbessert (EP 0 197 335). Ebenso wird durch erhöhte
Synthese der Threonindehydratase eine verbesserte Isoleucinbildung erreicht (EP 0
5 436 886).

Weitere Versuche zur Erhöhung der Aminosäureproduktion zielen auf eine
verbesserte Bereitstellung der zellulären Primärmetabolite des Zentralstoffwechsels.
So ist bekannt, daß die durch rekombinante Techniken erreichte Überexpression der
10 Transketolase eine verbesserte Produktbildung von L-Tryptophan, L-Tyrosin oder L-
Phenylalanin ermöglicht (EP 0 600 463). Weiterhin führt die Reduktion der
Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität in Corynebacterium zu verbesserter
Bildung aromatischer Aminosäuren (EP 0 333 145), wohingegen die Erhöhung der
Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität in Corynebacterium zu erhöhter
15 Ausscheidung von Aminosäuren der Aspartatfamilie führte (EP 0 358 940).

Während des Wachstums und speziell unter Aminosäureproduktionsbedingungen muß
der Tricarbonsäure-Cyclus kontinuierlich und effektiv mit C4-Verbindungen, z.B.
Oxalacetat, aufgefüllt werden, um die für die Aminosäurebiosynthese abgezogenen
20 Zwischenprodukte zu ersetzen. Bis vor kurzem hat man angenommen, daß für diese
sogenannten anaplerotischen Funktionen in Corynebacterium die
Phosphoenolpyruvat-Carboxylase verantwortlich ist (Kinoshita, Biology of industrial
micro-organisms 1985: 115 bis 142, Benjamin/Cummings Publishing Company,
London; Liebl, The prokaryotes II, 1991: 1157 bis 1171, Springer Verlag N.Y.;
25 Vallino und Stephanopoulos, Biotechnol Bioeng 1993, 41: 633 bis 646). Es wurde
jedoch gefunden, daß Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-negative Mutanten im
Vergleich zu den jeweiligen Ausgangsstämmen auf allen getesteten Medien gleich
wuchsen (Peters-Wendisch et al., FEMS Microbiology Letters 1993, 112: 269 bis
274; Gubler et al., Appl Microbiol Biotechnol 1994, 40: 857 bis 863). Dieses

Ergebnis zeigte, daß die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase nicht essentiell für das Wachstum ist und für die anaplerotischen Reaktionen keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt. Desweiteren wies das oben genannte Ergebnis darauf hin, daß es in *Corynebacterium* mindestens ein anderes Enzym geben muß, das für die Synthese von Oxalacetat, das für das Wachstum benötigt wird, verantwortlich ist. Kürzlich wurde auch tatsächlich eine Pyruvat-Carboxylase-Aktivität in permeabilisierten Zellen von *Corynebacterium glutamicum* gefunden (Peters-Wendisch et al., Microbiology 1997, 143: 1095 bis 1103). Dieses Enzym wird effektiv durch AMP, ADP und Acetyl-Coenzym A inhibiert und in Gegenwart von Laktat als Kohlenstoffquelle in erhöhter Menge gebildet. Da davon ausgegangen werden mußte, daß dieses Enzym in erster Linie für die Auffüllung des Tricarbonsäure-Cycluses beim Wachstum verantwortlich ist, war zu erwarten, daß eine Erhöhung der Genexpression bzw. der Enzymaktivität entweder zu keiner oder allenfalls zu einer geringfügigen Erhöhung der zur Aspartatfamilie gehörenden Aminosäuren führt. Desweiteren wurde erwartet, daß eine Erhöhung der Genexpression bzw. der Enzymaktivität der Pyruvat-Carboxylase ebenso keinen Einfluß auf die Produktion von Aminosäuren anderer Familien haben würde.

Es wurde nunmehr überraschenderweise gefunden, daß nach Erhöhung der Pyruvat-Carboxylase-Aktivität durch genetische Veränderung des Enzyms und / oder nach Erhöhung der Pyruvat-Carboxylase-Genexpression die mikrobielle Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder der Glutamatfamilie erhöht wird. Es zeigte sich, daß insbesondere Stämme mit erhöhter Kopienzahl des Pyruvat-Carboxylase-Gens etwa 50% mehr Lysin, 40% mehr Threonin und 150% mehr Homoserin ins Kulturmedium ausscheiden. Es zeigte sich weiterhin, daß überraschenderweise auch die Glutamatproduktion signifikant erhöht ist (vgl. insbesondere Ausführungsbeispiel unter 6. und Tabelle 4).

- Die genetische Veränderung der Pyruvat-Carboxylase zur Erhöhung der Enzymaktivität erfolgt vorzugsweise durch Mutation des endogenen Gens. Derartige
- 5 Mutationen können entweder nach klassischen Methoden ungerichtet erzeugt werden, wie beispielsweise durch UV-Bestrahlung oder durch mutationsauslösenden Chemikalien, oder gezielt mittels gentechnologischer Methoden wie Deletion(en), Insertion(en) und/oder Nukleotidaustausch(e).
- 10 Die Pyruvat-Carboxylase-Genexpression wird durch Erhöhen der Genkopienzahl und/oder durch Verstärkung regulatorischer Faktoren, die die Expression des Gens positiv beeinflussen, erhöht. So kann eine Verstärkung regulatorischer Elemente vorzugsweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem insbesondere die Transkriptionssignale erhöht werden. Dies kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß
- 15 durch Veränderung der dem Strukturgen vorgeschalteten Promotorsequenz der Promotor in seiner Wirksamkeit erhöht wird oder indem der Promotor komplett durch wirksamere Promotoren ausgetauscht wird. Auch kann eine Verstärkung der Transkription durch entsprechende Beeinflussung eines dem Pyruvat-Carboxylase-Gen zugeordneten Regulatorgens erfolgen. Desweiteren kann ggf durch Mutation
- 20 einer regulatorischen Gensequenz die Effektivität der Bindung eines Regulatorproteins an die DNA des zu regulierenden Pyruvat-Carboxylase-Gens so beeinflußt sein, daß dadurch die Transkription verstärkt und somit die Genexpression erhöht ist. Desweiteren können dem Pyruvat-Carboxylase-Gen als regulatorische Sequenzen aber auch sog. „enhancer“ zugeordnet sein, die über eine verbesserte
- 25 Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA ebenfalls eine erhöhte Pyruvat-Carboxylase-Genexpression bewirken. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der m-RNA verbessert wird.

Zur Erhöhung der Genkopienzahl wird das Pyruvat-Carboxylase-Gen in ein Genkonstrukt bzw. Vektor eingebaut. Das Genkonstrukt enthält insbesondere dem

5 Pyruvat-Carboxylase-Gen zugeordnete regulatorische Sequenzen, vorzugsweise solche, die die Genexpression verstärken. Für den Einbau des Pyruvat-Carboxylase-Gens in ein Genkonstrukt wird das Gen vorzugsweise aus einem Mikroorganismen-Stamm der Gattung *Corynebacterium* isoliert und in einen Aminosäure-produzierenden Mikroorganismen-Stamm, insbesondere *Corynebacterium* oder in

10 *Escherichia coli* oder *Serratia marcescens*, transformiert. Für das erfindungsgemäße Verfahren eignen sich insbesondere Gene aus *C. glutamicum* oder *C. glutamicum* ssp. *flavum* oder *C. glutamicum* ssp. *lactofermentum*. Nach Isolierung des Gens und der in vitro-Rekombination mit bekannten Vektoren (vgl. z.B. Simon et al., *Bio/Technology* 1983, 1: 784 bis 791; Eikmanns et al., *Gene* 1991, 102: 93 bis 98) erfolgt die

15 Transformation in die Aminosäure-produzierenden Stämme durch Elektroporation (Liebl et al., *FEMS Microbiology Letters* 1991, 65: 299 bis 304) oder Konjugation (Schäfer et al., *J Bacteriol* 1990, 172: 1663 bis 1666). Als Wirtsstämme werden vorzugsweise solche Aminosäureproduzenten eingesetzt, die in der Synthese der entsprechenden Aminosäure dereguliert sind und/oder die eine erhöhte Exportcarrier-

20 Aktivität für die entsprechende Aminosäure aufweisen. Weiterhin werden solche Stämme bevorzugt, die einen erhöhten Anteil an solchen Zentralstoffwechselmetaboliten enthalten, die an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligt sind und / oder Stämme, die einen erniedrigten Anteil an den nicht an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten

25 Zentralstoffwechselmetaboliten enthalten, insbesondere an Metaboliten, die für Konkurrenzreaktionen zuständig sind; d.h. es werden solche Stämme bevorzugt, bei denen ein zu dem entsprechenden Aminosäurebiosyntheseweg konkurrierender Biosyntheseweg mit verminderter Aktivität abläuft. So ist insbesondere ein, gegen L-Asparaginsäure- β -Methylester (AME) resistenter coryneformer Mikroorganismen-

30 Stamm mit reduzierter Citrat-Synthase-Aktivität geeignet (EP 0 551 614).

Nach Isolierung sind Pyruvat-Carboxylase-Gene mit Nukleotidsequenzen erhältlich, die für die unter SEQ ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz oder deren
5 Allelvariationen kodieren bzw. die die Nukleotidsequenz von Nukleotid 165 bis 3587 gemäß SEQ ID No. 1 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz aufweisen. Desweiteren sind Gene mit einem vorgeschalteten Promotor der Nukleotidsequenz von Nukleotid 20 bis 109 gemäß SEQ ID No. 1 oder eine im wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz erhältlich. Allelvariationen bzw.
10 gleichwirkende DNA-Sequenzen umfassen insbesondere funktionelle Derivate, die durch Deletion(en), Insertion(en) und/oder Substitution(en) von Nukleotiden aus entsprechenden Sequenzen erhältlich sind, wobei die Enzymaktivität bzw. -funktion erhalten bleibt oder sogar erhöht ist. Diese Pyruvat-Carboxylase-Gene werden vorzugsweise im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt.

15

Dem Pyruvat-Carboxylase-Gen mit oder ohne vorgeschaltetem Promotor bzw. mit oder ohne zugeordnetem Regulatorgen können ein oder mehrere DNA-Sequenzen vor- und/oder nachgeschaltet sein, so daß das Gen in einer Genstruktur enthalten ist.

20 Dem Pyruvat-Carboxylase-Gen ist vorzugsweise der tac-Promotor (lacI^Q -Gen) vorgeschaltet, wobei diesem insbesondere regulatorische Sequenzen zugeordnet sind.

Durch Klonierung des Pyruvat-Carboxylase-Gens sind Plasmide erhältlich, die das Gen enthalten und zur Transformation eines Aminosäureproduzenten geeignet sind.

25 Die durch Transformation erhältlichen Zellen, bei denen es sich vorzugsweise um transformierte Zellen von *Corynebacterium* handelt, enthalten das Gen in replizierbarer Form, d.h. in zusätzlichen Kopien auf dem Chromosom, wobei die Genkopien durch Rekombination an beliebigen Stellen des Genoms integriert werden, und/oder auf einem Plasmid oder Vektor.

Ausführungsbeispiel

5 1. Klonierung des Pyruvat-Carboxylase-Gens aus *Corynebacterium glutamicum*

Ausgehend von konservierten Bereichen aller bisher bekannten Pyruvat-Carboxylase-(pyc-)Genen, von *Saccharomyces cerevisiae* (J Biol Chem 1988, 263: 11493-11497; Mol Gen Genet 1991, 229: 307-315), Mensch (Biochim Biophys Acta 1994, 1227: 46-52), Maus (Proc Natl Acad Sci, USA 1993, 90: 1766-1770), *Aedes aegypti* (EMBL-GenBank: Accession Nr. L36530) sowie von *Mycobacterium tuberculosis* (EMBL-GenBank: Accession Nr. U00024) wurden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech). Die Primer entsprachen den Basen 810 bis 831 und 1015 bis 1037 des pyc-Gens von *M. tuberculosis*. Mit diesen Primern konnte mittels PCR nach der Standardmethode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) für nicht-degenerierte, homologe Primer ein Fragment von ca. 200 bp aus chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC 13032, die wie bei Eikmanns et al. (Microbiology 1994, 140: 1817-1828) beschrieben, isoliert wurde, amplifiziert werden. Die Größe von 200 bp entsprach der Erwartung für pyc-Gene. Das PCR-Produkt wurde wie bei Sanger et al. (Proc Natl Acad Sci USA 1977, 74: 5463-5467) beschrieben, sequenziert. Die Sequenzierung wurde mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs mit einer automatischen DNA-Sequenzierapparatur (Applied Biosystems) durchgeführt.

25

Ausgehend von diesem DNA-Fragment aus *C. glutamicum* wurden folgende homologe Oligonukleotide hergestellt:

| | | |
|-------|-----|-------------------------|
| pyc 1 | 5'- | CGTCTTCATCGAAATGAAC -3' |
| pyc 2 | 5'- | ACGGTGGTGATCCGGCACT -3' |

30

Die Oligonukleotide wurden als PCR-Primer zur Isolierung einer Sonde für das Gen der Pyruvat-Carboxylase (pyc) aus *C. glutamicum* verwendet. Die Primer wurden in
5 eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* und Digoxigenin-markierten Nukleotiden eingesetzt. Die Reaktion wurde nach der Vorschrift des 'PCR DIG Labeling Kits' der Firma Boehringer Mannheim durchgeführt. Mit diesem Ansatz konnte ein Digoxigenin-markiertes DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von ca. 200 bp entsprach. Die so hergestellte pyc-Sonde wurde
10 dann eingesetzt, um über Southern-Blot-Hybridisierung ein DNA-Fragment in der chromosomalen DNA von *C. glutamicum* zu identifizieren, auf dem das pyc-Gen lokalisiert ist. Hierzu wurden jeweils 2 bis 5 µg chromosomaler DNA von *C. glutamicum* WT mit den Restriktionsenzymen HindIII, SphI, SalI, DraI, EcoRI und BamHI geschnitten, die erhaltenen DNA-Fragmente 16 h bei 20 V in einem 0,8 %igen
15 Agarosegel gelelektrophoretisch ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Die in dem Agarosegel befindlichen DNA-Fragmente wurden nach einer Methode von Southern (J Mol Biol 1975, 98: 503-517) denaturiert und vakuumunterstützt mit der VacuGene Blot Apparatur von Pharmacia LKB (Uppsala, Schweden) aus der Gelmatrix auf eine Nylon-Membran (Nytran N13 von Schleicher und Schüll, Dassel, Schweiz)
20 transferiert, immobilisiert und die Digoxigeninmarkierung mittels NBT/X-Phosphat-Umsetzung durch alkalische Phosphatase nachgewiesen. Auf diese Weise konnten folgende, mit der pyc-DNA-Sonde hybridisierende chromosomale Fragmente nachgewiesen werden: ein 17 kb HindIII-Fragment, ein 6,5 kb SalI-Fragment und ein 1,35 kb EcoRI-Fragment.

25

Das 17 kb HindIII-Fragment wurde isoliert und subkloniert. Dazu wurde eine Cosmid-Genbank aus chromosomaler DNA von *C. glutamicum* im Cosmid pH79 verwendet, die das Genom von *C. glutamicum* zu 99% repräsentierte (Mol Microbiol 1992, 6: 317-326). Der *E. coli*-Stamm DH5α wurde mit dieser Genbank mittels der

30

CaCl₂-Methode von Sambrook et al. (Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) transformiert und zu ca. 300 Kolonien pro

5 LB-Agarplatte mit 50 µg/l Kanamycin ausplattiert (insgesamt 5000 Kolonien). Anschließend wurden die erhaltenen Transformanten auf Nytran N13-Filter übertragen und diese zur alkalischen Lyse der Zellen und Denaturierung der DNA auf mit 0,5 M NaOH und 1,5 M NaCl getränktem Whatmann-Papier 5 min. inkubiert. Die darauffolgende Neutralisierung erfolgte mit 1 M Tris/HCl pH 7,5 und 1,5 M NaCl.

10 Nach Inkubation der Filter in 2 x SSC wurde die freigesetzte DNA durch UV-Bestrahlung bei 366 nm auf dem Filter fixiert. Anschließend wurden die restlichen Zelltrümmer durch Schütteln in 3 x SSC, 0,1 % SDS bei 50°C entfernt. Die Filter wurden in dieser Form für die Hybridisierung mit einer spezifischen pyc-Sonde, wie bei Southern (J Mol Biol 1975, 98: 503-517) beschrieben, verwendet. Es wurden 3

15 Transformanten identifiziert, die gegen die pyc-Sonde hybridisierten. Aus diesen Transformanten wurde die Cosmid-DNA mittels Plasmid-Präparation nach der Methode der alkalischen Lyse von Birnboim (Meth Enzymol 1983, 100: 243-255) isoliert und anschließend über Restriktion und Southern-Blot Analyse auf das Vorhandensein des HindIII-Fragments getestet. Das Cosmid pHC79-10, das ein 40 kb

20 Insert enthielt, trug das 17 kb HindIII-Fragment vollständig und wurde weiter analysiert. Es zeigte sich, daß auch nach Restriktion mit den Endonukleasen Sall und EcoRI die gleichen hybridisierenden Fragmente wie in der chromosomalen DNA, d.h. ein 6,5 kb Sall- und ein 1,35 kb EcoRI-Fragment, erhalten wurden. Das 17 kb HindIII-Fragment wurde durch Restriktion mit HindIII aus dem Cosmid isoliert und in den E.

25 coli-Vektor pUC18, der ebenfalls mit HindIII geschnitten wurde, ligiert. Es wurde eine Restriktionsanalyse des Fragments in dem resultierenden Vektor pUCpyc erstellt. Die physikalische Kartierung des Fragments ist in Figur 1 dargestellt.

2. Sequenzierung des Pyruvat-Carboxylase-Gens

5 In weiteren Subklonierungsschritten wurden ein 0,85 kb SalI-EcoRI-Fragment, das 1,35 kb EcoRI-Fragment, ein 1,6 kb EcoRI-EcoRI-StuI-Fragment sowie ein 1,6 kb ClaI-Fragment, das partiell mit dem 0,85 kb SalI-EcoRI-Fragment überlappte, durch Restriktion mit den entsprechenden Restriktionsenzymen aus dem Plasmid pUCpyc isoliert. Durch Ligation wurden die Fragmente in den jeweils entsprechend
10 restringierten Vektor pUC18 kloniert und anschließend nach Sanger et al. (Proc Natl Acad Sci USA 1977, 74: 5463-5467) wie oben beschrieben sequenziert. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden mit dem Programmpaket HUSAR (Release 3.0) des Deutschen Krebsforschungszentrums (Heidelberg) analysiert. Die Sequenzanalyse der Fragmente ergab ein durchgehendes offenes Leseraster von 3576
15 bp, das für eine Proteinsequenz von 1140 Aminosäuren kodiert. Ein Vergleich der abgeleiteten Proteinsequenz mit der EMBL Gen-Datenbank (Heidelberg) ergab Ähnlichkeiten zu allen bekannten Pyruvat-Carboxylasen. Die höchste Identität (62%) wurde zur putativen Pyruvat-Carboxylase aus *Mycobacterium tuberculosis* (EMBL-GenBank: Accession Nr. U00024) gefunden. Die Ähnlichkeit betrug, unter
20 Berücksichtigung konservierter Aminosäureaustausche, 76%. Ein Vergleich mit den Pyruvat-Carboxylasen anderer Organismen ergab 46 bis 47% identische und 64 bis 65% ähnliche Aminosäuren (Gene 1997, 191: 47-50; J Bacteriol 1996, 178: 5960-5970; Proc Natl Acad Sci USA 1993, 90: 1766-1770; Biochem J 1996, 316: 631-637; EMBL-GenBank: Accession Nr. L36530; J Biol Chem 1988, 263: 11493-11497; Mol
25 Gen Genet 1991, 229: 307-315). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß das klonierte Fragment das Gen für die Pyruvat-Carboxylase aus *C. glutamicum* trägt. Die Nukleotidsequenz des Gens ist unter SEQ ID No.1 und die entsprechende Aminosäuresequenz unter SEQ ID No. 2 angegeben.

3. Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens

5 Zur Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase aus *C. glutamicum* wurde das Gen aus dem Plasmid pUCpyc als 6,2 kb SspI-ScaI-Fragment in den *E. coli*-*C. Glutamicum*-Pendelvektor pEK0 (Gene 1991, 102: 93-98) kloniert, der mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und PstI geschnitten wurde. Mittels Klenow-Polymerase-Behandlung wurden die überhängenden Enden zu glatten Enden
10 aufgefüllt (EcoRI) bzw. abgedaut (PstI), und der linearisierte Vektor wurde mit dem 6,2 kb SspI-ScaI-Fragment ligiert. Das erhaltene Konstrukt pEK0pyc wurde zunächst in den Stamm *E. coli* DH5 α transformiert, die Plasmid-DNA auf den erhaltenen Transformanten isoliert und auf die Richtigkeit des Inserts durch Restriktion kontrolliert. Die DNA wurde anschließend in den Stamm SP733 durch
15 Elektroporation eingebracht (FEMS Microbiol Lett 1989, 65: 299-304). Bei diesem Stamm handelt es sich um eine Mutante des restriktionsnegativen *C. glutamicum* Stammes R127 (Dechema Biotechnology Conference 1990, 4: 323-327, Verlag Chemie), die durch chemische Mutagenese erhalten worden war und sich dadurch auszeichnet, daß sie nicht auf Minimalmedium mit Pyruvat und Lactat als einziger
20 Kohlenstoffquelle wachsen kann (Microbiology 1997, 143: 1095-1103). Dieser Phänotyp wird durch einen Defekt in der Pyruvat-Carboxylase hervorgerufen und konnte durch das Einbringen des Pyruvat-Carboxylase-Gens aus *C. glutamicum* komplementiert werden, d.h. der Stamm, der das Plasmid pEK0pyc trägt, war im Gegensatz zum Ausgangsstamm wieder in der Lage auf Minimalmedium mit Lactat
25 als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Damit war auch der Beweis erbracht, daß das Gen für eine funktionelle Pyruvat-Carboxylase kodiert.

Darüber hinaus wurde das Plasmid pEK0pyc in den *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 durch Elektroporation transformiert. Der resultierende Stamm WT (pEK0pyc)

wurde im Vergleich zum Wildtyp ATCC 13032 bezüglich seiner Pyruvat-Carboxylase-Aktivität untersucht. Die Stämme wurden in Komplexmedium (Luria-Bertani, Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) mit 0,5 % Lactat und auf Minimalmedium mit 2 % Lactat bzw. 4 % Glukose gezüchtet, und der Pyruvat-Carboxylase-Test wurde entsprechend der Methode, wie sie bei Peters-Wendisch et al. (Microbiology 1997, 143: 1095-1103) beschrieben wurde, durchgeführt. Das Ergebnis der Analyse (Tabelle 1) zeigt, daß die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität im pEK0-pyc-tragenden Stamm ca. 4-fach höher als im Ausgangsstamm war.

4. Gesteigerte Akkumulation von Lysin durch Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens im Stamm *C. glutamicum* DG52-5

Zur Untersuchung der Auswirkung der Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase in dem Lysin-Produktionsstamm DG52-5 (J Gen Microbiol 1988, 134: 3221-3229) wurde der Expressionsvektor pVWEX1 verwendet, der eine IPTG-induzierbare Expression erlaubt. In diesen Vektor wurde das pyc Gen promotorlos hinein kloniert. Dazu wurden zunächst PCR-Primer (Primer 1 = Position 112 - 133; Primer 2 = Position 373 bis 355 in der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID No. 1) synthetisiert und 261 bp des promotorlosen Anfangsbereichs des Pyruvat-Carboxylase-Gens mittels PCR amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, daß Primer 1 eine PstI-Schnittstelle vermittelt und Primer 2 eine BamHI-Schnittstelle. Nach der PCR wurde das erhaltene 274 bp PCR-Produkt isoliert, zu Konkaternen ligiert und anschließend mit den Restriktionsenzymen PstI und BamHI geschnitten. Der Restriktionsansatz wurde durch Ethanol-Fällung ankonzentriert und anschließend mit dem PstI-BamHI-geschnittenen Vektor pVWEX1 ligiert. Das erhaltene Konstrukt

pVWEX1-PCR wurde durch Restriktion getestet. Der Endbereich des pyc Gens wurde durch RcaI-Klenow-SalI-Behandlung aus dem Vektor pEK0pyc isoliert und in den BamHI-Klenow-SalI behandelten Vektor pVWEX1-PCR ligiert. Das erhaltene Konstrukt pVWEX1pyc wurde durch Restriktionskartierung analysiert. Eine physikalische Karte des Plasmids ist in Figur 2 gezeigt.

Das Plasmid wurde durch Elektroporation in den *C. glutamicum* Stamm DG52-5 eingebracht. Als Kontrolle wurde der Stamm DG52-5 mit dem Vektor pVWEX1 ohne Insert transformiert und die L-Lysinausscheidung jeweils drei verschiedener Transformanten verglichen. Dazu wurden DG52-5(pVWEX1)1, 2 und 3 sowie DG52-5(pVWEX1pyc)3, 4 und 6 in Komplexmedium (2xTY; Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press; mit 50 µg/l Kanamycin) gezüchtet und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol 1993, 175: 5595-5603) jeweils aus den Vorkulturen getrennt beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich Kanamycin, um die Plasmide stabil zu halten. Es wurden jeweils zwei parallele Ansätze durchgeführt, wobei einem Kolben 200 µg IPTG/ml zugesetzt wurde, während der zweite Kolben kein IPTG enthielt. Nach Kultivierung für 48 Stunden bei 30°C auf dem Rotationsschüttler bei 120 Upm wurde die in das Medium akkumulierte Lysinmenge bestimmt. Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (J Chromat 1983, 266: 471-482). Das Ergebnis der Fermentation ist in Tabelle 2 dargestellt, wobei die angegebenen Werte Mittelwerte aus jeweils drei Experimenten mit unterschiedlichen Klonen darstellen. Es zeigte sich, daß die Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens zu einer um 50 % gesteigerten Akkumulation von Lysin im Medium führt. Somit stellt die Nutzung des entdeckten und beschriebenen Gens für das anaplerotische Enzym Pyruvat-Carboxylase ein Verfahren dar, um die L-Lysinbildung entscheidend zu verbessern.

**5. Gesteigerte Akkumulation von Threonin und Homoserin durch
Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens im Stamm *C. glutamicum*
DM368-3**

Analog zu den Experimenten zur L-Lysin-Bildung wurde auch die Akkumulation von Threonin im Kulturüberstand durch Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase untersucht. Hierzu wurde, wie unter Punkt 4 beschrieben, der Threoninproduktionsstamm *C. glutamicum* DM368-3 (Degussa AG) mit dem Plasmid pVWEX1pyc sowie zur Kontrolle mit dem Plasmid pVWEX1 transformiert und die Threoninausscheidung von jeweils drei verschiedenen Transformanten untersucht. Dazu wurden DM368-3(pVWEX1)1, 2 und 3 sowie DM368-3(pVWEX1pyc)1, 2 und 3 in Komplexmedium (2xTY mit 50 µg/l Kanamycin) gezüchtet und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol 1993, 175: 5595-5603) jeweils aus den Vorkulturen getrennt beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich Kanamycin, um die Plasmide stabil zu halten. Es wurden zwei parallele Ansätze durchgeführt, wobei einem Kolben 200 µg IPTG/ml zugesetzt wurde, während der zweite Kolben kein IPTG enthielt. Nach Kultivierung für 48 Stunden bei 30°C auf dem Rotationsschüttler bei 120 Upm wurde die in das Medium akkumulierte Threoninmenge bestimmt. Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration erfolgte ebenfalls mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (J Chromat 1983, 266: 471-482). Das Ergebnis der Fermentation ist in Tabelle 3 dargestellt, wobei die angegebenen Werte Mittelwerte aus jeweils drei Experimenten mit unterschiedlichen Klonen darstellen. Es zeigte sich, daß die Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens zu einer ca. 40%igen Steigerung der Threoninkonzentration im Medium führt. Somit stellt die Nutzung des entdeckten und beschriebenen Gens für das anaplerotische Enzym Pyruvat-Carboxylase ein Verfahren dar, um die L-Threoninbildung entscheidend zu verbessern.

Desweiteren zeigte die Aminosäurekonzentrationsbestimmung, daß überraschenderweise der Stamm mit überexprimiertem Pyruvat-Carboxylase-Gen außerdem etwa 150% mehr Homoserin ins Medium ausschied als der Stamm mit nicht überexprimiertem Gen. Die entsprechenden Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 3 dargestellt. Sie machen deutlich, daß durch das erfindungsgemäße Verfahren sowohl die Threonin- als auch die Homoserinbildung entscheidend verbessert werden kann.

10 **6. Gesteigerte Akkumulation von Glutamat durch Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase im Wildtyp von *C. glutamicum***

Analog zu den Experimenten zur L-Lysin-, L-Threonin- und L-Homoserin-Bildung (siehe oben unter 4. und 5.) wurde auch die Akkumulation von Glutamat im Kulturüberstand durch Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase untersucht. Hierzu wurde, wie unter Punkt 4 beschrieben, der Wildtyp *C. glutamicum* ATCC 13032 mit dem Plasmid pVWEX1pyc sowie zur Kontrolle mit dem Plasmid pVWEX1 transformiert und die Glutamatausscheidung von jeweils zwei verschiedenen Transformanten untersucht. Dazu wurde *C. glutamicum* ATCC 13032 (pVWEX1pyc) D1 und D2 sowie *C. glutamicum* ATCC 13032 (pVWEX1pyc) 1 und 2 in Komplexmedium (2xTY mit 50 µg/l Kanamycin) gezüchtet und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol 1993, 175: 5595-5603) jeweils aus den Vorkulturen getrennt beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich Kanamycin, um die Plasmide stabil zu halten. Zur Induktion der Glutamatausscheidung wurde dem Medium ca. 6 Stunden nach dem Inokulieren 25 mg Tween 60 pro ml zugesetzt. Es wurden zwei parallele Ansätze durchgeführt, wobei einem Kolben 200 µg IPTG/ml zugesetzt wurde, während der zweite Kolben kein IPTG enthielt. Nach Kultivierung für 48 Stunden bei 30°C auf dem Rotationsschüttler bei 120 Upm wurde die in das Medium akkumulierte Glutamatmenge bestimmt. Die Bestimmung der

Aminosäurekonzentration erfolgte ebenfalls mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (J Chromat 1983, 266: 471-482). Das Ergebnis der
5 Fermentation ist in Tabelle 4 dargestellt, wobei die angegebenen Werte Mittelwerte aus jeweils zwei Experimenten mit unterschiedlichen Klonen darstellen. Es zeigte sich, daß die Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens zu einer bis zu 500%igen Steigerung der Glutamatkonzentration im Medium führt. Somit stellt die Nutzung des entdeckten und beschriebenen Gens für das anaplerotische Enzym Pyruvat-
10 Carboxylase ein Verfahren dar, um die L-Glutamatbildung entscheidend zu verbessern.

| Stamm | IPTG [$\mu\text{g/ml}$] | Pyruvat-Carboxylase [$\text{nmol min}^{-1} \text{ mg Trockengewicht}^{-1}$] |
|--------------------|------------------------------|--|
| 13032(pEK0pyc) | 0 | 75 ± 13 |
| ATCC 13032 | 0 | 19 ± 4 |
| DG52-5(pVWEX1pyc) | 200 | 88 ± 13 |
| | 0 | 11 ± 2 |
| DG52-5(pVWEX1) | 200 | 5 ± 2 |
| | 0 | 6 ± 1 |
| DM368-3(pVWEX1pyc) | 200 | 76 ± 10 |
| | 0 | 12 ± 3 |
| DM368-3(pVWEX1) | 200 | 10 ± 1 |
| | 0 | 11 ± 2 |

Tabelle 1

| Stamm | IPTG [µg/ml] | Lysin [mM] |
|-------------------|-----------------|---------------|
| DG52-5(pVWEX1pyc) | 200 | 35,4 ± 2,6 |
| | 0 | 23,6 ± 2,9 |
| DG52-5(pVWEX1) | 200 | 23,3 ± 2,9 |
| | 0 | 22,1 ± 4,0 |

Tabelle 2

| Stamm | IPTG [µg/ml] | Threonin [mM] | Homoserin [mM] |
|--------------------|-----------------|------------------|-------------------|
| DM368-3(pVWEX1pyc) | 200 | 10,2 ± 0,5 | 14,4 ± 1,2 |
| | 0 | 7,9 ± 1,0 | 5,6 ± 0,2 |
| DM368-3(pVWEX1) | 200 | 8,0 ± 0,5 | 5,8 ± 0,7 |
| | 0 | 7,5 ± 0,8 | 6,1 ± 1,0 |

Tabelle 3

| Stamm | IPTG [µg/ml] | Glutamat [mM] |
|------------------------|-----------------|------------------|
| ATCC 13032 | 200 | 11 ± 2 |
| ATCC 13032 | 0 | 13 ± 2 |
| ATCC 13032(pVWEX1-pyc) | 200 | 67 ± 4 |
| ATCC 13032(pVWEX1-pyc) | 0 | 32 ± 4 |

Tabelle 4

5 Patentansprüche

1. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat-
und/oder Glutamatfamilie, bei dem die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität durch
10 genetische Veränderung des Enzyms und / oder die Pyruvat-Carboxylase-
Genexpression eines die entsprechende Aminosäure produzierenden
Mikroorganismus erhöht wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
15 dadurch gekennzeichnet,
daß durch Mutation des endogenen Pyruvat-Carboxylase-Gens ein Enzym
mit höherer Pyruvat-Carboxylase-Aktivität erzeugt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
20 dadurch gekennzeichnet,
daß die Genexpression der Pyruvat-Carboxylase durch Erhöhen der
Genkopienzahl erhöht wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3,
25 dadurch gekennzeichnet,
daß zur Erhöhung der Genkopienzahl das Pyruvat-Carboxylase-Gen in ein
Genkonstrukt eingebaut wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,
5 daß das Gen in ein Genkonstrukt eingebaut wird, das dem Pyruvat-Carboxylase-Gen zugeordnete regulatorische Gensequenzen enthält.
6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5,
dadurch gekennzeichnet,
10 daß ein die entsprechende Aminosäure produzierender Mikroorganismus mit dem das Gen enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet,
15 daß ein Mikroorganismus der Gattung Corynebacterium mit dem das Gen enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.
8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, in dem die an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Enzyme dereguliert sind und / oder die eine erhöhte Exportcarrier-Aktivität für die entsprechende Aminosäure aufweisen.
- 25 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, der einen erhöhten Anteil an den an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9,
dadurch gekennzeichnet,
5 daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, bei dem ein
zu dem entsprechenden Aminosäurebiosyntheseweg konkurrierender Biosyn-
theseweg mit verminderter Aktivität abläuft.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
10 dadurch gekennzeichnet,
daß das Pyruvat-Carboxylase-Gen aus einem Mikroorganismus-Stamm der
Gattung Corynebacterium isoliert wird.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
15 dadurch gekennzeichnet,
daß die Genexpression durch Verstärkung der Transkriptionssignale erhöht
wird.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
20 dadurch gekennzeichnet,
daß dem Pyruvat-Carboxylase-Gen der tac-Promotor vorgeschaltet wird.
14. Verfahren nach Anspruch 13,
gekennzeichnet durch
25 dem tac-Promotor zugeordnete regulatorische Sequenzen.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Pyruvat-Carboxylase-Gen ein Gen mit einer für die unter SEQ ID
30 No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz und deren Allelvariationen

kodierenden Nukleotidsequenz eingesetzt wird.

- 5 16. Verfahren nach Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Pyruvat-Carboxylase-Gen ein Gen mit der Nukleotidsequenz von
Nukleotid 165 bis 3587 gemäß SEQ ID No. 1 oder einer im wesentlichen
gleichwirkenden DNA-Sequenz eingesetzt wird.
- 10 17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung von
Lysin, Threonin, Homoserin, Glutamat und/oder Arginin.
18. Pyruvat-Carboxylase-Gen mit einer für die unter SEQ ID No. 2
15 angegebenen Aminosäuresequenz und / oder deren Allelvariationen
kodierenden Nukleotidsequenz.
19. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 18 mit der Nukleotidsequenz von
Nukleotid 165 bis 3587 gemäß SEQ ID Nr. 1 oder einer im wesentlichen
20 gleichwirkenden DNA-Sequenz.
20. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 18 oder 19 mit einem
vorgeschalteten Promotor der Nukleotidsequenz von Nukleotid 20 bis 109
gemäß SEQ ID No. 1 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-
25 Sequenz.
21. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 18 oder 19 mit vorgeschaltetem
tac-Promotor

22. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 21 mit dem Promotor
zugeordneten regulatorischen Sequenzen.
- 5 23. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche 18 bis 20 mit diesem
zugeordnete regulatorische Gensequenzen.
- 10 24. Genstruktur, enthaltend ein Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der
Ansprüche 18 bis 23.
25. Vektor, enthaltend ein Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche
18 bis 23 oder eine Genstruktur nach Anspruch 24.
- 15 26. Transformierte Zelle, enthaltend in replizierbarer Form ein Pyruvat-
Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche 18 bis 23 oder eine Genstruktur
nach Anspruch 24.
- 20 27. Transformierte Zelle nach Anspruch 26, enthaltend einen Vektor nach
Anspruch 25.
- 25 28. Transformierte Zelle nach Anspruch 26 oder 27,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie der Gattung *Corynebacterium* angehört.
29. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 26 bis 28,
dadurch gekennzeichnet,
daß in dieser die an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten
Enzyme und / oder die am Export der entsprechenden Aminosäure
30 beteiligten Enzyme dereguliert sind.

30. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 26 bis 29,
dadurch gekennzeichnet,
5 daß sie einen erhöhten Anteil an den an der Synthese der entsprechenden
Aminosäure beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.
31. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 26 bis 30,
dadurch gekennzeichnet,
10 daß sie einen erniedrigten Anteil an den nicht an der Synthese der
entsprechenden Aminosäure beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten
enthält.
32. Verwendung eines Pyruvat-Carboxylase-Gens zur Steigerung der
15 Produktion von aus der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie stammenden
Aminosäuren von Mikroorganismen.
33. Verwendung nach Anspruch 32,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß ein mutiertes Pyruvat-Carboxylase-Gen, das für ein Enzym mit erhöhter
Pyruvat-Carboxylase-Aktivität kodiert, verwendet wird.
34. Verwendung nach Anspruch 32 oder 33,
dadurch gekennzeichnet,
25 daß der die entsprechende Aminosäure produzierende Mikroorganismus mit
einem Genkonstrukt, das ein Pyruvat-Carboxylase-Gen enthält, transformiert
wird.

35. Verwendung nach Anspruch 34,

dadurch gekennzeichnet,

5 daß das Genkonstrukt zusätzlich regulatorische Gensequenzen enthält.

36. Verwendung nach einem der Ansprüche 32 bis 35,

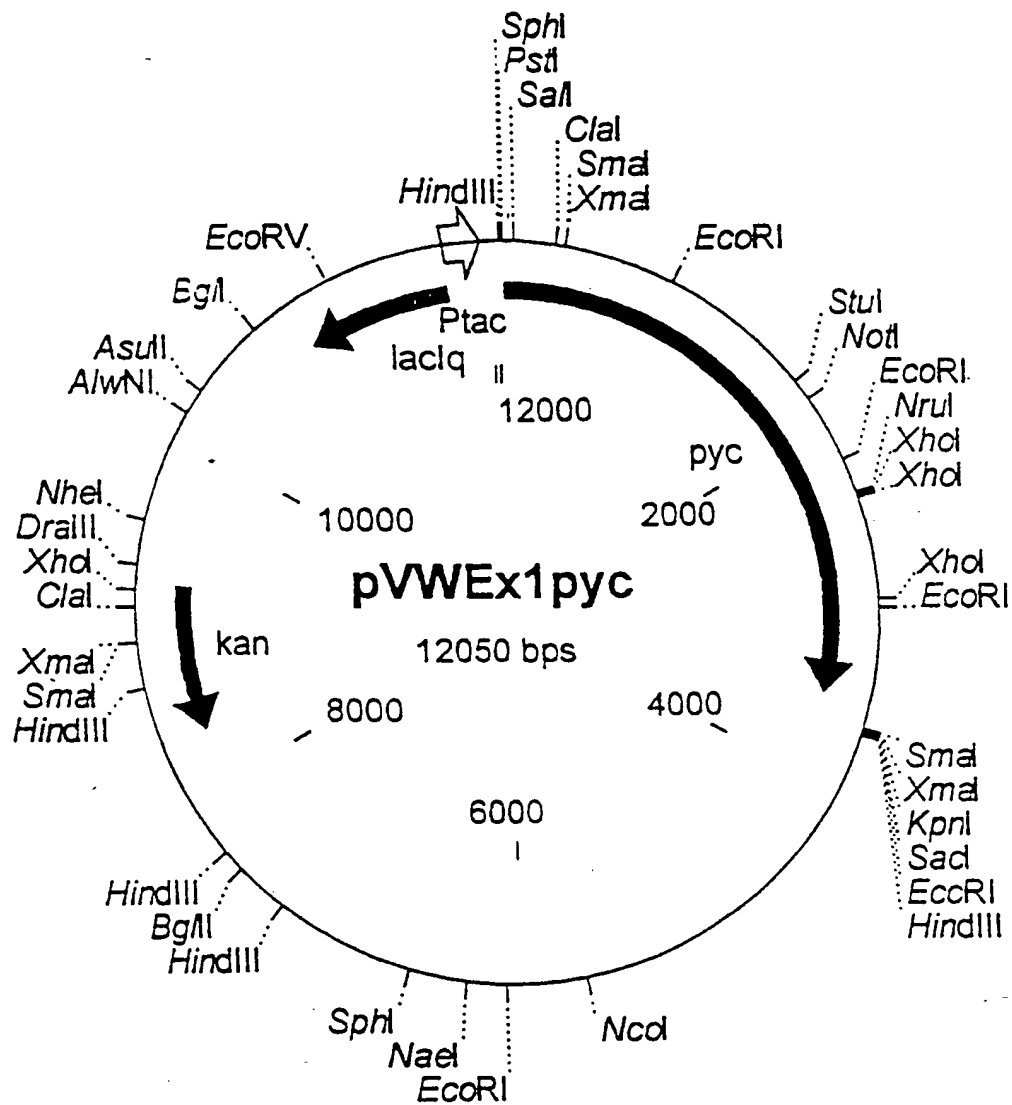
dadurch gekennzeichnet,

10 daß ein Pyruvat-Carboxylase-Gen aus Corynebacterium verwendet wird.

37. Verwendung nach einem der Ansprüche 32 bis 36,

dadurch gekennzeichnet,

15 daß als Aminosäure-produzierender Mikroorganismus Corynebacterium verwendet wird.



Figur 2

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Forschungszentrum Juelich GmbH
- (B) STRASSE: Postfach 1913
- (C) ORT: Juelich
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 52425

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Pyruvat Carboxylase

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 3728 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

| | |
|--|-----|
| CGCAACCGTG CTTGAAGTCG TGCAGGTCAG GGGAGTGTG CCCGAAAACA TTGAGAGGAA | 60 |
| AACAAAAACC GATGTTTGAT TGGGGGAATC GGGGGTTACG ATACTAGGAC GCAGTGACTG | 120 |
| CTATCACCTC TGGCGGTCTC TTGTTGAAAG GAATAATTAC TCTAGTGTG ACTCACACAT | 180 |
| CTTCAACGCT TCCAGCATTC AAAAAGATCT TGGTAGCAA CCGCGGCGAA ATCGCGGTCC | 240 |
| GTGCTTTCCG TGCAGCACTC GAAACCGGTG CAGCCACGGT AGCTATTTAC CCCC GTGAAG | 300 |
| ATCGGGGATC ATTCCACCGC TCTTTTGCTT CTGAAGCTGT CCGCATTGGT ACCGAAGGCT | 360 |
| CACCACTCAA GCGGTACCTG GACATCGATG AAATTATCGG TGCAGCTAAA AAAGTTAAAG | 420 |
| CAGATGCCAT TTACCCGGGA TACGGCTTCC TGTCTGAAAA TGCCAGCTT GCCC GCGAGT | 480 |

| | |
|---|------|
| GTGCGAAAA CGGCATTACT TTTATTGGCC CAACCCAGAG GGTTCCTGAT CTCACCGGTG | 540 |
| ATAAGTCTCG CGCGGTAACC GCCGCGAAGA AGGCTGGTCT GCCAGTTTTC GCGGAATCCA | 600 |
| CCCCGAGCAA AAACATCGAT GAGATCGTTA AAAGCGCTGA AGGCCAGACT TACCCCATCT | 660 |
| TTGTGAAGGC AGTTGCCGGT GGTGGCGGAC GCGGTATGCG TTTTGTGCT TCACCTGATG | 720 |
| AGCTTCGCAA ATTAGCAACA GAAGCATCTC GTGAAGCTGA AGCGGCTTTC GGCGATGGCG | 780 |
| CGGTATATGT CGAACGTGCT GTGATTAACC CTCAGCATAT TGAAGTGCAG ATCCTTGGCG | 840 |
| ATCACACTGG AGAAGTTGTA CACCTTTATG AACGTGACTG CTCACTGCAG CGTCGTCACC | 900 |
| AAAAAGTTGT CGAAATTGCG CCAGCACAGC ATTTGGATCC AGAACTGCGT GATCGCATTT | 960 |
| GTGCGGATGC AGTAAAGTTC TGCCGCTCCA TTGGTTACCA GGGCGCGGGA ACCGTGGAAT | 1020 |
| TCTTGGTCGA TGAAGAGGGC AACCACGTCT TCATCGAAAT GAACCCACGT ATCCAGGTTG | 1080 |
| AGCACACCGT GACTGAAGAA GTCACCGAGG TGGACCTGGT GAAGGCGCAG ATGCGCTTGG | 1140 |
| CTGCTGGTGC AACCTTGAAG GAATTGGGTC TGACCCAAGA TAAGATCAAG ACCCACGGTG | 1200 |
| CAGCACTGCA GTGCCGCATC ACCACGGAAG ATCCAAACAA CGGCTTCCGC CCAGATACCG | 1260 |
| GAATATCAC CGCGTACCGC TCACCAGGCG GAGCTGGCGT TCGTCTTGAC GGTGCAGCTC | 1320 |
| AGCTCGGTGG CGAAATCACC GCACACTTTG ACTCCATGCT GGTGAAATG ACCTGCCGTG | 1380 |
| GTTCCGACTT TGAAACTGCT GTTGCTCGTG CACAGCGCGC GTTGGCTGAG TTCACCGTGT | 1440 |
| CTGGTGTGTC AACCAACATT GGTTCCTTGC GTGCGTTGCT GCGGGAAGAG GACTTCACTT | 1500 |
| CCAAGCGCAT CGCCACCGGA TTCATTGCCG ATCACCCGCA CCTCCTTCAG GCTCCACCTG | 1560 |
| CTGATGATGA GCAGGGACGC ATCTGGATT ACTTGGCAGA TGTCACCGTG AACAAGCCTC | 1620 |
| ATGGTGTGCG TCCAAAGGAT GTTGACGCTC CTATCGATAA GCTGCCTAAC ATCAAGGATC | 1680 |
| TGCCACTGCC ACGCGGTTCC CGTGACCGCC TGAAGCAGCT TGGCCCAGCC GCGTTTGCTC | 1740 |
| GTGATCTCCG TGAGCAGGAC GCACTGGCAG TTAGTGATAC CACCTTCCGC GATGCACACC | 1800 |
| AGTCTTTGCT TGCGACCCGA GTCCGCTCAT TCGCACTGAA GCCTGCGGCA GAGGCCGTGC | 1860 |
| CAAAGCTGAC TCCTGAGCTT TTGTCCGTGG AGGCCTGGGG CGGCGCGACC TACGATGTGG | 1920 |
| CGATGCGTTT CCTCTTTGAG GATCCGTGGG ACAGGCTCGA CGAGCTGCGC GAGGCGATGC | 1980 |
| CGAATGTAAA CATTGAGATG CTGCTTCGCG GCCGCAACAC CGTGGGATAC ACCCGTACC | 2040 |
| CAGACTCCGT CTGCCGCGCG TTTGTTAAGG AAGCTGCCAG CTCCGGCGTG GACATCTTCC | 2100 |

| | |
|--|------|
| GCATCTTCGA CGCGCTTAAC GACGTCTCCC AGATGCGTCC AGCAATCGAC GCAGTCCTGG | 2160 |
| AGACCAACAC CGCGGTAGCC GAGGTGGCTA TGGCTTATTC TGGTGATCTC TCTGATCCAA | 2220 |
| ATGAAAAGCT CTACACCCTG GATTACTACC TAAAGATGGC AGAGGAGATC GTCAAGTCTG | 2280 |
| GCGCTCACAT CTTGGCCATT AAGGATATGG CTGGTCTGCT TCGCCCAGCT GCGGTAACCA | 2340 |
| AGCTGGTCAC CGCACTGCGC CGTGAATTCG ATCTGCCAGT GCACGTGCAC ACCCAGACA | 2400 |
| CTGCGGGTGG CCAGCTGGCA ACCTACTTTG CTGCAGCTCA AGCTGGTGCA GATGCTGTTG | 2460 |
| ACGGTGCTTC CGCACCCTG TCTGGCACCA CCTCCCAGCC ATCCCTGTCT GCCATTGTTG | 2520 |
| CTGCATTGCG GCACACCCGT CGCGATACCG GTTTGAGCCT CGAGGCTGTT TCTGACCTCG | 2580 |
| AGCCGTACTG GGAAGCAGTG CGCGGACTGT ACCTGCCATT TGAGTCTGGA ACCCCAGGCC | 2640 |
| CAACCGGTCG CGTCTACCGC CACGAAATCC CAGGCGGACA GTTGTCCAAC CTGCGTGCAC | 2700 |
| AGGCCACCGC ACTGGGCCTT GCGGATCGTT TCGAACTCAT CGAAGACAAC TACGCAGCCG | 2760 |
| TTAATGAGAT GCTGGGACGC CCAACCAAGG TCACCCCATC CTCCAAGGTT GTTGGCGACC | 2820 |
| TCGCACTCCA CCTCGTTGGT GCGGGTGTGG ATCCAGCAGA CTTTGCTGCC GATCCACAAA | 2880 |
| AGTACGACAT CCCAGACTCT GTCATCGCGT TCCTGCGCGG CGAGCTTGGT AACCTCCAG | 2940 |
| GTGGCTGGCC AGAGCCACTG CGCACCCGCG CACTGGAAGG CCGCTCCGAA GGCAAGGCAC | 3000 |
| CTCTGACGGA AGTTCCTGAG GAAGAGCAGG CGCACCTCGA CGCTGATGAT TCCAAGGAAC | 3060 |
| GTCGCAATAG CCTCAACCGC CTGCTGTTCC CGAAGCCAAC CGAAGAGTTC CTCGAGCACC | 3120 |
| GTCGCCGCTT CGGCAACACC TCTGCGCTGG ATGATCGTGA ATTCTTCTAC GGCCTGGTCG | 3180 |
| AAGGCCGCGA GACTTTGATC CGCCTGCCAG ATGTGCGCAC CCCACTGCTT GTTCGCCTGG | 3240 |
| ATGCGATCTC TGAGCCAGAC GATAAGGGTA TCGCCAATGT TGTGGCCAAC GTCAACGGCC | 3300 |
| AGATCCGCCC AATGCGTGTG CGTGACCGCT CCGTTGAGTC TGTCACCGCA ACCGCAGAAA | 3360 |
| AGGCAGATTC CTCCAACAAG GGCCATGTTG CTGCACCATT CGCTGGTGTT GTCACCGTGA | 3420 |
| CTGTTGCTGA AGGTGATGAG GTCAAGGCTG GAGATGCAGT CGCAATCATC GAGGCTATGA | 3480 |
| AGATGGAAGC AACAATCACT GCTTCTGTTG ACGGCAAAAT CGATCGCGTT GTGGTTCTCTG | 3540 |
| CTGCAACGAA GGTGGAAGGT GGC GACTTGA TCGTCGTCGT TTCCTAAACC TTTCTGTAAA | 3600 |
| AAGCCCCGCG TCTTCCTCAT GGAGGAGGCG GGGCTTTTTG GGCCAAGATG GGAGATGGGT | 3660 |
| GAGTTGGATT TGGTCTGATT CGACACTTTT AAGGGCAGAG ATTTGAAGAT GGAGACCAAG | 3720 |

GCTCAAAG

3728

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1140 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Ser Thr His Thr Ser Ser Thr Leu Pro Ala Phe Lys Lys Ile Leu
1 5 10 15

Val Ala Asn Arg Gly Glu Ile Ala Val Arg Ala Phe Arg Ala Ala Leu
20 25 30

Glu Thr Gly Ala Ala Thr Val Ala Ile Tyr Pro Arg Glu Asp Arg Gly
35 40 45

Ser Phe His Arg Ser Phe Ala Ser Glu Ala Val Arg Ile Gly Thr Glu
50 55 60

Gly Ser Pro Val Lys Ala Tyr Leu Asp Ile Asp Glu Ile Ile Gly Ala
65 70 75 80

Ala Lys Lys Val Lys Ala Asp Ala Ile Tyr Pro Gly Tyr Gly Phe Leu
85 90 95

Ser Glu Asn Ala Gln Leu Ala Arg Glu Cys Ala Glu Asn Gly Ile Thr
100 105 110

Phe Ile Gly Pro Thr Pro Glu Val Leu Asp Leu Thr Gly Asp Lys Ser
115 120 125

Arg Ala Val Thr Ala Ala Lys Lys Ala Gly Leu Pro Val Leu Ala Glu
130 135 140

Ser Thr Pro Ser Lys Asn Ile Asp Glu Ile Val Lys Ser Ala Glu Gly
145 150 155 160

Gln Thr Tyr Pro Ile Phe Val Lys Ala Val Ala Gly Gly Gly Arg
165 170 175

Gly Met Arg Phe Val Ala Ser Pro Asp Glu Leu Arg Lys Leu Ala Thr
180 185 190

Glu Ala Ser Arg Glu Ala Glu Ala Ala Phe Gly Asp Gly Ala Val Tyr

| 195 | 200 | 205 |
|--|-----|---------|
| Val Glu Arg Ala Val Ile Asn Pro Gln His Ile Glu Val Gln Ile Leu 210 | 215 | 220 |
| Gly Asp His Thr Gly Glu Val Val His Leu Tyr Glu Arg Asp Cys Ser 225 | 230 | 235 240 |
| Leu Gln Arg Arg His Gln Lys Val Val Glu Ile Ala Pro Ala Gln His 245 | 250 | 255 |
| Leu Asp Pro Glu Leu Arg Asp Arg Ile Cys Ala Asp Ala Val Lys Phe 260 | 265 | 270 |
| Cys Arg Ser Ile Gly Tyr Gln Gly Ala Gly Thr Val Glu Phe Leu Val 275 | 280 | 285 |
| Asp Glu Lys Gly Asn His Val Phe Ile Glu Met Asn Pro Arg Ile Gln 290 | 295 | 300 |
| Val Glu His Thr Val Thr Glu Glu Val Thr Glu Val Asp Leu Val Lys 305 | 310 | 315 320 |
| Ala Gln Met Arg Leu Ala Ala Gly Ala Thr Leu Lys Glu Leu Gly Leu 325 | 330 | 335 |
| Thr Gln Asp Lys Ile Lys Thr His Gly Ala Ala Leu Gln Cys Arg Ile 340 | 345 | 350 |
| Thr Thr Glu Asp Pro Asn Asn Gly Phe Arg Pro Asp Thr Gly Thr Ile 355 | 360 | 365 |
| Thr Ala Tyr Arg Ser Pro Gly Gly Ala Gly Val Arg Leu Asp Gly Ala 370 | 375 | 380 |
| Ala Gln Leu Gly Gly Glu Ile Thr Ala His Phe Asp Ser Met Leu Val 385 | 390 | 395 400 |
| Lys Met Thr Cys Arg Gly Ser Asp Phe Glu Thr Ala Val Ala Arg Ala 405 | 410 | 415 |
| Gln Arg Ala Leu Ala Glu Phe Thr Val Ser Gly Val Ala Thr Asn Ile 420 | 425 | 430 |
| Gly Phe Leu Arg Ala Leu Leu Arg Glu Glu Asp Phe Thr Ser Lys Arg 435 | 440 | 445 |
| Ile Ala Thr Gly Phe Ile Ala Asp His Pro His Leu Leu Gln Ala Pro 450 | 455 | 460 |
| Pro Ala Asp Asp Glu Gln Gly Arg Ile Leu Asp Tyr Leu Ala Asp Val 465 | 470 | 475 480 |
| Thr Val Asn Lys Pro His Gly Val Arg Pro Lys Asp Val Ala Ala Pro | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|-----|
| | | | | 485 | | | | | | 490 | | | | | | | | | 495 |
| Ile | Asp | Lys | Leu | Pro | Asn | Ile | Lys | Asp | Leu | Pro | Leu | Pro | Arg | Gly | Ser | | | | |
| | | | 500 | | | | | 505 | | | | | 510 | | | | | | |
| Arg | Asp | Arg | Leu | Lys | Gln | Leu | Gly | Pro | Ala | Ala | Phe | Ala | Arg | Asp | Leu | | | | |
| | | 515 | | | | | 520 | | | | | 525 | | | | | | | |
| Arg | Glu | Gln | Asp | Ala | Leu | Ala | Val | Thr | Asp | Thr | Thr | Phe | Arg | Asp | Ala | | | | |
| | 530 | | | | | 535 | | | | | 540 | | | | | | | | |
| His | Gln | Ser | Leu | Leu | Ala | Thr | Arg | Val | Arg | Ser | Phe | Ala | Leu | Lys | Pro | | | | |
| 545 | | | | | 550 | | | | | 555 | | | | | 560 | | | | |
| Ala | Ala | Glu | Ala | Val | Ala | Lys | Lys | Thr | Pro | Glu | Leu | Leu | Ser | Val | Glu | | | | |
| | | | 565 | | | | | | 570 | | | | | 575 | | | | | |
| Ala | Trp | Gly | Gly | Ala | Thr | Tyr | Asp | Val | Ala | Met | Arg | Phe | Leu | Phe | Glu | | | | |
| | | 580 | | | | | | 585 | | | | | 590 | | | | | | |
| Asp | Pro | Trp | Asp | Arg | Leu | Asp | Glu | Leu | Arg | Glu | Ala | Met | Pro | Asn | Val | | | | |
| | | 595 | | | | | 600 | | | | | 605 | | | | | | | |
| Asn | Ile | Gln | Met | Leu | Leu | Arg | Gly | Arg | Asn | Thr | Val | Gly | Tyr | Thr | Pro | | | | |
| | 610 | | | | | 615 | | | | | 620 | | | | | | | | |
| Tyr | Pro | Asp | Ser | Val | Cys | Arg | Ala | Phe | Val | Lys | Glu | Ala | Ala | Ser | Ser | | | | |
| 625 | | | | | 630 | | | | | 635 | | | | | 640 | | | | |
| Gly | Val | Asp | Ile | Phe | Arg | Ile | Phe | Asp | Ala | Leu | Asn | Asp | Val | Ser | Gln | | | | |
| | | | 645 | | | | | | 650 | | | | | 655 | | | | | |
| Met | Arg | Pro | Ala | Ile | Asp | Ala | Val | Leu | Glu | Thr | Asn | Thr | Ala | Val | Ala | | | | |
| | | | 660 | | | | | 665 | | | | | 670 | | | | | | |
| Glu | Val | Ala | Met | Ala | Tyr | Ser | Gly | Asp | Leu | Ser | Asp | Pro | Asn | Glu | Lys | | | | |
| | | 675 | | | | | 680 | | | | | 685 | | | | | | | |
| Leu | Tyr | Thr | Leu | Asp | Tyr | Tyr | Leu | Lys | Met | Ala | Glu | Glu | Ile | Val | Lys | | | | |
| | 690 | | | | | 695 | | | | | 700 | | | | | | | | |
| Ser | Gly | Ala | His | Ile | Leu | Ala | Ile | Lys | Asp | Met | Ala | Gly | Leu | Leu | Arg | | | | |
| 705 | | | | | 710 | | | | | 715 | | | | | 720 | | | | |
| Pro | Ala | Ala | Val | Thr | Lys | Leu | Val | Thr | Ala | Leu | Arg | Arg | Glu | Phe | Asp | | | | |
| | | | 725 | | | | | | 730 | | | | | 735 | | | | | |
| Leu | Pro | Val | Val | His | Thr | His | Asp | Thr | Ala | Gly | Gly | Gln | Leu | Ala | | | | | |
| | | 740 | | | | | 745 | | | | | 750 | | | | | | | |
| Thr | Tyr | Phe | Ala | Ala | Ala | Gln | Ala | Gly | Ala | Asp | Ala | Val | Asp | Gly | Ala | | | | |
| | | 755 | | | | | 760 | | | | | 765 | | | | | | | |
| Ser | Ala | Pro | Leu | Ser | Gly | Thr | Thr | Ser | Gln | Pro | Ser | Leu | Ser | Ala | Ile | | | | |

| 770 | 775 | 780 |
|---|------|-----------|
| Val Ala Ala Phe Ala His Thr Arg Arg Asp Thr Gly Leu Ser Leu Glu 785 | 790 | 795 800 |
| Ala Val Ser Asp Leu Glu Pro Tyr Trp Glu Ala Val Arg Gly Leu Tyr 805 | 810 | 815 |
| Leu Pro Phe Glu Ser Gly Thr Pro Gly Pro Thr Gly Arg Val Tyr Arg 820 | 825 | 830 |
| His Glu Ile Pro Gly Gly Gln Leu Ser Asn Leu Arg Ala Gln Ala Thr 835 | 840 | 845 |
| Ala Leu Gly Leu Ala Asp Arg Phe Glu Leu Ile Glu Asp Asn Tyr Ala 850 | 855 | 860 |
| Ala Val Asn Glu Met Leu Gly Arg Pro Thr Lys Val Thr Pro Ser Ser 865 | 870 | 875 880 |
| Lys Val Val Gly Asp Leu Ala Leu His Leu Val Gly Ala Gly Val Asp 885 | 890 | 895 |
| Pro Ala Asp Phe Ala Ala Asp Pro Gln Lys Tyr Asp Ile Pro Asp Ser 900 | 905 | 910 |
| Val Ile Ala Phe Leu Arg Gly Glu Leu Gly Asn Pro Pro Gly Gly Trp 915 | 920 | 925 |
| Pro Glu Pro Leu Arg Thr Arg Ala Leu Glu Gly Arg Ser Glu Gly Lys 930 | 935 | 940 |
| Ala Pro Leu Thr Glu Val Pro Glu Glu Glu Gln Ala His Leu Asp Ala 945 | 950 | 955 960 |
| Asp Asp Ser Lys Glu Arg Arg Asn Ser Leu Asn Arg Leu Leu Phe Pro 965 | 970 | 975 |
| Lys Pro Thr Glu Glu Phe Leu Glu His Arg Arg Arg Phe Gly Asn Thr 980 | 985 | 990 |
| Ser Ala Leu Asp Asp Arg Glu Phe Phe Tyr Gly Leu Val Glu Gly Arg 995 | 1000 | 1005 |
| Glu Thr Leu Ile Arg Leu Pro Asp Val Arg Thr Pro Leu Leu Val Arg 1010 | 1015 | 1020 |
| Leu Asp Ala Ile Ser Glu Pro Asp Asp Lys Gly Met Arg Asn Val Val 1025 | 1030 | 1035 1040 |
| Ala Asn Val Asn Gly Gln Ile Arg Pro Met Arg Val Arg Asp Arg Ser 1045 | 1050 | 1055 |
| Val Glu Ser Val Thr Ala Thr Ala Glu Lys Ala Asp Ser Ser Asn Lys | | |

| 1060 | 1065 | 1070 |
|---|------|-----------|
| Gly His Val Ala Ala Pro Phe Ala Gly Val Val Thr Val Thr Val Ala 1075 | 1080 | 1085 |
| Glu Gly Asp Glu Val Lys Ala Gly Asp Ala Val Ala Ile Ile Glu Ala 1090 | 1095 | 1100 |
| Met Lys Met Glu Ala Thr Ile Thr Ala Ser Val Asp Gly Lys Ile Asp 1105 | 1110 | 1115 1120 |
| Arg Val Val Val Pro Ala Ala Thr Lys Val Glu Gly Gly Asp Leu Ile 1125 | 1130 | 1135 |
| Val Val Val Ser 1140 | | |



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | |
|---|-----------|--|
| INTERNATIONALE ZUSAMMENFASSUNG FÜR DEN GEBIET DES PATENTS | | |
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12P 13/20, C12N 15/60 // (C12P 13/20, C12R 1:15) | A3 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/18228 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. April 1999 (15.04.99) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06210 (22) Internationales Anmeldedatum: 30. September 1998 (30.09.98) (30) Prioritätsdaten: 197 43 894.6 4. Oktober 1997 (04.10.97) DE 198 31 609.7 14. Juli 1998 (14.07.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Postfach 1913, D-52425 Jülich (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EIKMANN, Bernd [DE/DE]; Gleißelstetten 49, D-89081 Ulm (DE). PE- TERS-WENDISCH, Petra [DE/DE]; Steinenkamp 1, D-51496 Bergisch-Gladbach (DE). SAHM, Hermann [DE/DE]; Wendelinusstrasse 71, D-52428 Jülich (DE). (74) Anwalt: PIELKEN, Petra; Becker-Gundahl-Strasse 36, D-81479 München (DE). | | (81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, HU, ID, JP, KR, MX, RU, SK, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen- berichts: 20. Mai 1999 (20.05.99) |

(54) Title: METHOD FOR MICROBIAL PRODUCTION OF AMINO ACIDS OF THE ASPARTATE AND/OR GLUTAMATE FAMILY AND AGENTS WHICH CAN BE USED IN SAID METHOD

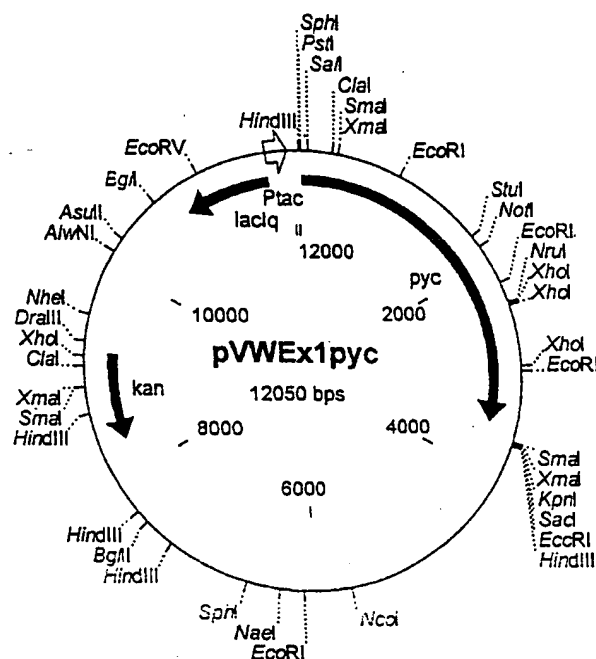
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR MIKROBIELLEN HERSTELLUNG VON AMINOSÄUREN DER ASPARTAT- UND/ODER GLUTAMATFAMILIE UND IM VERFAHREN EINSETZBARE MITTEL

(57) Abstract

The invention relates to a method for microbial production of amino acids of the aspartate and/or glutamate family in which the pyruvate-carboxylase activity is increased by genetically changing the enzyme and/or the pyruvate-carboxylase gene expression of a microorganism which produces the corresponding amino acid. In addition, the invention relates to a pyruvate-carboxylase gene and additional agents which can be used in the inventive method.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie, bei dem die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität durch genetische Veränderung des Enzyms und/oder die Pyruvat-Carboxylase-Genexpression eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung ein Pyruvat-Carboxylase-Gen sowie weitere, im erfindungsgemäßen Verfahren einsetzbare Mittel.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidshjan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | | | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | ML | Mali | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MN | Mongolei | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MR | Mauretanien | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MW | Malawi | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | MX | Mexiko | | |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CM | Kamerun | | | PL | Polen | | |
| CN | China | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CU | Kuba | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CZ | Tschechische Republik | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| DE | Deutschland | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DK | Dänemark | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| EE | Estland | LR | Liberia | SG | Singapur | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/06210

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁶: C12P 13/20, C12N 15/60 // (C12P 13/20, C12R 1:15)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁶: C12P, C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, PAJ, EPODOC, STRAND, BIOSIS, CA, MEDLINE, SCISEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| P,X | Microbiology, Vol. 144, 1998, Petra G. Peters-Wendisch et al, "Pyruvate carboxylase from Corynebacterium glutamicum: Characterization, expression and inactivation of the pyc gene", page 915 - page 927, see the whole article | 1-37 |
| P,X | EMBL, Databas Genbank/DBJ, Accession no. Y09548, Peters-Wendisch P.G. et al: "Pyruvate carboxylase from Corynebacterium glutamicum: Characterization, expression and inactivation of the pyc gene", & 11 February 1998, page 20-109, 165-3587 | 18-25 |
| X | Appl Microbiol Biotechnol; Vol. 47, 1997; S.M. Park et al, "Elucidation of anaplerotic pathways in Corynebacterium glutamicum via 13C-NMR spectroscopy and GC-MS", page 430 - page 440, see the whole article, in particular page 431, column 2, lines 7-18 | 1-37 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 February 1999 (17.02.99)

Date of mailing of the international search report

09 March 1999 (09.03.99)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/06210

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A | Microbiology, Vol. 143, 1997, Petra G. Peters-Wendisch et al, "Pyruvate Carboxylase as an Anaplerotic enzyme in Corynebacterium glutamic- um", page 1095 - page 1103, see the abstract and the discussion | 1-37 |
| A | Chemical Abstracts, Vol. 126, Nr 12, 24 March 1997 (24.03.97), (Columbus, Ohio, USA), Peters-Wendisch, Petra, "Anaplerotic reactions in Corynebacterium glutamicum. Studies of the significance of phosphoen- olpyruvate (PEP)-carboxylase and pyruvate-carboxylase in the central metabolism and in amino acid produc- tion", THE ABSTRACT Nr 154946, Ber. Forschungszent. July 1996, 1-121 | 1-37 |
| A | Applied and Environmental Microbiology, Vol. 62, Nr 2, February 1996, Muriel Coccagn-Bousquet et al, "Growth Rate-Dependent Modulation of carbon Flux through Central Metabolism and the Kinetic Consequen- ces for Glucose-Limited Chemostat Cultures of Coryne- bacterium glutamicum", page 429 - page 436, see abstract; page 433, column 2, lines 6-32 | 1-37 |
| A | EP 0723011 A1 (AJINOMOTO CO., INC.), 24 July 1996 (24.07.96), see abstract | 1-37 |
| A | Databas Pir, accession no. S73055, R. Smith et al: "Mycobacterium tuberculosis cosmid tbc2", EMBL Data Library, September 1994, a.a. 1-1144 | 18 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

02/02/99

International application No.
PCT/EP 98/06210

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP 0723011 A1 | 24/07/96 | AU 682547 B | 09/10/97 |
| | | AU 8099194 A | 21/03/95 |
| | | BR 9407625 A | 21/01/97 |
| | | PL 313119 A | 10/06/96 |
| | | SK 20496 A | 06/11/96 |
| | | CA 2169170 A | 02/03/95 |
| | | CN 1133615 A | 16/10/96 |
| | | CZ 9600524 A | 12/06/96 |
| | | HU 73690 A | 30/09/96 |
| | | HU 9600240 D | 00/00/00 |
| | | JP 7111890 A | 02/05/95 |
| | | WO 9506114 A | 02/03/95 |
| | | JP 8070860 A | 19/03/96 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06210

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPC6: C12P 13/20, C12N 15/60 // (C12P 13/20, C12R 1:15)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPC6: C12P, C12N

Recherte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI, PAJ, EPODOC, STRAND, BIOSIS, CA, MEDLINE, SCISEARCH

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| P,X | Microbiology, Band 144, 1998, Petra G. Peters-Wendisch et al, "Pyruvate carboxylase from Corynebacterium glutamicum: characterization, expression and inactivation of the pyc gene", Seite 915 - Seite 927, Siehe den ganzen Artikel -- | 1-37 |
| P,X | EMBL, Databas Genbank/DBJ, accession no. Y09548, Peters-Wendisch P.G. et al: "Pyruvate carboxylase from Corynebacterium glutamicum: characterization, expression and inactivation of the pyc gene", & 11 Feb 1998, nt 20-109, 165-3587 -- | 18-25 |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen.☒ Siehe Anhang Patentfamilie.

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T"

Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X"

Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y"

Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&"

Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17 Februar 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

09.03.99

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde



Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

HAMPUS RYSTEDT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06210

C (Fortsetzung). ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X | Appl Microbiol Biotechnol, Band 47, 1997, S.M. Park et al, "Elucidation of anaplerotic pathways in Corynebacterium glutamicum via 13C-NMR spectroscopy and GC-MS", Seite 430 - Seite 440, Siehe den ganzen Artikel, besonders Seite 431, Spalte 2, Zeilen 7-18 -- | 1-37 |
| A | Microbiology, Band 143, 1997, Petra G. Peters-Wendisch et al, "Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in Corynebacterium glutamicum", Seite 1095 - Seite 1103, Siehe die Zusammenfassung und die Diskussion -- | 1-37 |
| A | Chemical Abstracts, Band 126, Nr 12, 24 März 1997 (24.03.97), (Columbus, Ohio, USA), Peters-Wendisch, Petra, "Anaplerotic reactions in Corynebacterium glutamicum. Studies of the significance of phosphoenolpyruvate (PEP)-carboxylase and pyruvate-carboxylase in the central metabolism and in amino acid production", THE ABSTRACT Nr 154946, Ber. Forschungszent. Juelich 1996, 1-121 -- | 1-37 |
| A | Applied and Environmental Microbiology, Band 62, Nr 2, Februar 1996, Muriel Coccagn-Bousquet et al, "Growth Rate-Dependent Modulation of Carbon Flux through Central Metabolism and the Kinetic Consequences for Glucose-Limited Chemostat Cultures of Corynebacterium glutamicum", Seite 429 - Seite 436, Siehe die Zusammenfassung; Seite 433, Spalte 2, Zeilen 6-32 -- | 1-37 |
| A | EP 0723011 A1 (AJINOMOTO CO., INC.), 24 Juli 1996 (24.07.96), Siehe die Zusammenfassung -- | 1-37 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06210

C (Fortsetzung). ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| A | Databas Pir, accession no. S73055, R. Smith et al: "Mycobacterium tuberculosis cosmid tbc2", EMBL Data Library, September 1994, a.a. 1-1144 -- ----- | 18 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören
02/02/99

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/06210

| Im Recherchenbericht angefurtes Patendokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| EP 0723011 A1 | 24/07/96 | AU 682547 B | 09/10/97 |
| | | AU 8099194 A | 21/03/95 |
| | | BR 9407625 A | 21/01/97 |
| | | PL 313119 A | 10/06/96 |
| | | SK 20496 A | 06/11/96 |
| | | CA 2169170 A | 02/03/95 |
| | | CN 1133615 A | 16/10/96 |
| | | CZ 9600524 A | 12/06/96 |
| | | HU 73690 A | 30/09/96 |
| | | HU 9600240 D | 00/00/00 |
| | | JP 7111890 A | 02/05/95 |
| | | WO 9506114 A | 02/03/95 |
| | | JP 8070860 A | 19/03/96 |